

Utilisation des cellules KB pour le diagnostic de la maladie de Newcastle et le titrage du virus *

Par J. RAMISSE, H. SERRES, E. RAKOTONDRAMARY

RÉSUMÉ

Nous avons étudié le comportement du virus de Newcastle sur les cellules KB. Le virus produit un effet cytopathogène marqué aboutissant à la lyse des cellules. Le test d'hémadsorption est positif avec les hématies de poule. Le liquide surnageant de centrifugation des cultures infectées est faiblement hémagglutinant. Par la technique d'immuno-fluorescence, l'antigène viral apparaît surtout dans le cytoplasme cellulaire. Le virus du 1^{er} passage sur KB est vaccinant.

Les virus sauvages peuvent être isolés et caractérisés dans les cultures de KB. Ceci permet un diagnostic facile et assez rapide de la maladie.

Les titrages de virulence des organes de poulets inoculés montrent que la rate et le poumon sont très riches en virus. Quelques organes contiennent du virus décelable dès 24 heures après l'inoculation.

L'utilisation des cellules KB dans le titrage des virus de Newcastle fait apparaître des résultats assez proches de ceux obtenus sur embryons. Les cellules ont une sensibilité plus homogène que les embryons.

Le diagnostic de la maladie de Newcastle n'est pas toujours facile, ni commode. Sur le cadavre les lésions sont de moins en moins pathognomoniques. La réaction d'I. H. A. qui donne des résultats significatifs ne peut pas être employée dans les cas où les antécédents sont mal connus, ou bien s'il s'agit d'une évolution suraiguë, ou si les animaux ont été vaccinés. Le recours à l'inoculation nécessite d'avoir en permanence à sa disposition des poulets neufs ou des embryons sensibles. L'inoculation à des poulets implique un isolement rigoureux des sujets inoculés. Il ne faut pas que les inoculés aient pu se contaminer au préalable, ni qu'ils

puissent mutuellement se contaminer au cas où plusieurs diagnostics sont en cours en même temps. Ces exigences rendent plus incommodes l'inoculation aux poulets comme méthode de diagnostic.

Par ailleurs le titrage des virus qui se fait d'ordinaire sur embryons nécessite un assez grand nombre d'embryons qu'il n'est pas toujours facile de se procurer. De plus dans une série d'embryons, certains peuvent être moins sensibles, car ils sont protégés par des anticorps passifs provenant de la pondeuse vaccinée. Les résultats des titrages sont alors modifiés par l'hétérogénéité des embryons.

Il est permis de penser, par contre, que l'isolement ou le titrage du virus de Newcastle sur des cellules en culture peut dans une certaine mesure pallier les inconvénients des techniques précédentes. Il est connu que le virus de Newcastle cultive bien sur fibroblastes de poulet

* N. D. L. R. Nous reproduisons « in extenso » l'article original de J. RAMISSE et collaborateurs déjà paru dans le tome XXII, n° 2, mais qu'une erreur de mise en pages avait rendu inintelligible.

(PEREIRA, 1954 ; MASON, 1955) sur les cellules HELA (TYRRELL, 1955), sur les cellules Hep 2 (GELENGZEL et Coll.), sur les cellules rénales de singe (CHANOCK, 1955), de porc (SHIMIZU, 1957), de bovin (BANKOWSKI, 1957 ; PROVOST, 1962), de lapin (BANKOWSKI, 1958).

Les cellules de souche ou de lignée présentent pour le diagnostic un avantage sur les cellules de première explantation. On peut en disposer en permanence, et leur entretien est très facile et peu coûteux.

En 1962 PIGOURY, MICHEL et CHABASSOL ont montré un pouvoir pathogène du virus de Newcastle pour les cellules de la souche KB.

Nous avons pensé qu'il serait peut-être possible d'employer ce système cellulaire pour les diagnostics et les titrages.

Nous avons étudié les propriétés du virus de Newcastle multiplié sur les cellules KB : effet cytopathogène, hémadsorption, hémagglutination, immunofluorescence, pouvoir immunogène. A partir de prélèvements pour diagnostic, nous avons inoculé simultanément des poulets neufs et des cellules KB et nous avons comparé les résultats. Nous avons essayé ensuite de localiser le virus dans l'organisme inoculé (titrage du virus dans les organes, délai d'apparition après l'inoculation). Enfin nous avons titré parallèlement diverses souches de virus sur embryons et sur cellule KB.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1° Système cellulaire :

Les cellules KB nous ont été fournies par l'Institut Pasteur de Tananarive. Nous les cultivons en boîtes de Jouan et en tubes de 16/160. Le milieu de culture est du Earle-hydrolysate de caséine supplémenté avec du Yeast extract (0,5 p. 100) et du sérum de veau (10 p. 100). Le pH du milieu est de 7,3-7,4.

Les cellules sont passées une fois par semaine en les traitant par le versène (sans trypsine). Leur multiplication est très rapide, la nappe est complète en 48 heures. L'entretien de ces cellules est très facile : elles sont peu fragiles, et l'on peut les congeler et les conserver en toute sécurité au congélateur (— 75 °C), soit avec de la glycérine ou du diméthyl-sulfoxyde (à 10 p. 100).

2° Virus de Newcastle :

Nous avons travaillé avec des virus sauvages plus ou moins pathogènes provenant de cadavres de poulets amenés au Service de Diagnostics, ou avec des virus entretenus sur embryons de poulet : virus-vaccin avirulent ou virus pathogènes. Les virus entretenus sur embryons sont conservés congelés ou lyophilisés. Ils ont été titrés par inoculation à l'embryon de poulet et par hémagglutination.

3° Les embryons de poulet :

Ils sont âgés de 9 jours. Les œufs proviennent de pondeuses vaccinées avec du vaccin vivant.

4° Inoculation des poulets, des embryons et des cellules :

— *Virus entretenu sur embryons.* Le liquide allantoïdien infecté est inoculé aux poulets par voie sous-cutanée : 1 ml de virus pur, soit environ 10⁶ DMM. Les symptômes et la mortalité surviennent 3 ou 4 jours après. Pour l'inoculation aux embryons, le virus est dilué au 1/3 dans une solution d'antibiotiques (Pénicilline : 500 U/ml — Streptomycine : 500 µg/ml), et l'on injecte 0,1 ml par voie allantoïdienne. Les embryons inoculés sont incubés à 37 °C. On note, au mirage, la mortalité en 48 heures et 72 heures. On ouvre les œufs contenant les embryons morts, pour vérifier la présence des lésions. Une réaction d'hémagglutination est pratiquée sur du liquide allantoïdien. Pour inoculer les cellules KB, le virus est dilué dans la solution de HANKS de 10⁻⁶ à 10⁻¹⁵. On rejette le milieu de croissance des tubes, et pour chaque dilution, on inocule 1 ml par tube (3 ou 4 tubes par dilution de virus). L'adsorption se fait pendant 2 heures à la température du Laboratoire, puis on élimine l'inoculum, et l'on introduit le milieu d'entretien qui est analogue au milieu de croissance. L'incubation est faite à 37 °C pendant plusieurs jours. Au 3^e jour, si les cellules ne sont pas lysées, le milieu est renouvelé. Chaque jour, on note l'effet cytopathogène et sur les cultures positives l'on complète par un test d'hémadsorption avec des hématies de poule lavées.

— *Pour les virus sauvages,* on prélève sur les cadavres les organes : poumons, rate, foie, reins, cerveau et éventuellement le caillot sanguin du

cœur. Si l'on recherche le virus dans un but de diagnostic, on découpe des fragments de ces organes que l'on mélange. On pèse l'ensemble et on immerge ces fragments dans une solution concentrée d'antibiotiques (Pénicilline 500 U/ml, Streptomycine 500/ μ g/ml) et de Mycostatine (500 u/ml) pendant 10 minutes environ. On retire la solution d'antibiotiques, on broie en présence de sable stérile, puis l'on ajoute la solution de HANKS pour avoir une suspension au 1/10^e. Le surnageant de centrifugation constitue l'inoculum. On inocule 1 ml aux poulets, 0,1 ml aux embryons et 1 ml aux cellules. Si l'on désire rechercher et titrer le virus dans les divers organes, on broie de la même façon chaque organe séparément. Les dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁴⁰ sont faites en solution de HANKS. Pour la recherche du virus dans le sang, on hémolyse le sang au congélateur et on le dilue au 1/10^e (ou plus) dans la solution de HANKS.

Les résultats sont notés comme pour le virus de collection.

5^e Techniques d'héماغglutination et d'héماغsorption :

La technique d'héماغglutination est décrite dans une publication antérieure (RAMISSE et Coll. 1967). Elle s'applique également aux cultures cellulaires infectées et centrifugées.

L'héماغsorption est pratiquée avec des héماغties de poule sélectionnées comme étant héماغglutinables par le virus de Newcastle. On lave les héماغties plusieurs fois en eau physiologique tamponnée à pH 7, et l'on prépare une suspension à 0,5 p. 100 en solution de HANKS. On rejette le milieu d'entretien des cellules infectées et l'on introduit environ 1 ml par tube de la suspension d'héماغties. Après 5 ou 10 minutes, on lave plusieurs fois avec la solution de HANKS pour éliminer les héماغties non fixées. On opère de même avec une culture cellulaire témoin non infectée. Les cultures sont examinées au microscope inversé. Nous avons également fixé avec du Bouin des cultures cellulaires ayant adsorbé des héماغties, et nous les avons colorées à l'héماغteine-éosine pour les photographier.

6^e Technique d'immunofluorescence :

Nous avons caractérisé l'antigène viral dans les cellules KB infectées en les traitant avec des

globulines anti-Newcastle conjuguées à l'isothiocyanate de Fluoresceine.

Production et conjugaison des globulines.

Nous avons immunisé des poulets avec du liquide allantoidien infecté mélangé à de l'adjuvant de FREUND. Le titre I. H. A. du mélange des sérums de poulet était, en fin d'immunisation, de 1/32.768. Nous avons fractionné le pool de sérums au sulfate d'ammonium à 1/2 saturation. La solution de globulines ramenée au volume du sérum et dialysée conserve encore un titre inhibiteur de l'héماغglutination de 1/32.768. La concentration des globulines (Biuret) est de 15 mg/ml.

La conjugaison au fluorochrome est faite à 4^o et à l'obscurité pendant 18 heures en présence de tampon carbonate à pH 9,5. Le rapport du poids de fluorochrome au poids des globulines est de 1/50^e. Le conjugué est ensuite fractionné sur une colonne de Sephadex G 50. La première fraction, correspondant aux globulines conjuguées, présente un titre inhibiteur de l'héماغglutination de 1/16.384. Cette fraction a un volume à peu près égal à celui du sérum initial.

Le conjugué est conservé merthiolaté, à + 4^o et à l'obscurité.

Fixation, coloration, montage et examen des cellules.

Les cellules cultivées sur lamelles, inoculées ou non, sont fixées, après 48 heures d'incubation, à l'acétone à - 30^o. On les rince ensuite plusieurs fois dans une solution physiologique tamponnée (PBS), puis on les recouvre avec le conjugué pur ou dilué. On laisse agir 1 heure à 37^o. On lave ensuite abondamment avec du PBS et l'on applique un colorant de contraste (Bleu de méthylène au 1/1.000^e). Après rinçage, les lamelles sont montées avec de la glycérine tamponnée (pH 7,8). Nous les examinons en lumière ultraviolette (équipement classique).

7^e Etude du pouvoir immunogène :

Avec le virus du 1^{er} passage sur cellules KB nous avons vacciné par voie sous-cutanée (1 ml), 4 lots de 4 poulets : virus pur et dilué à 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³. Les poulets ont été éprouvés 7 jours plus tard, ainsi que 2 témoins.

RÉSULTATS OBTENUS

A. — Comportement des virus de Newcastle sur cellules KB

1° Effet cytopathogène :

Le délai d'apparition de cet effet est fonction de la dilution du virus. Jusqu'à 10^{-4} , 10^{-5} , le virus lyse complètement ou partiellement la nappe en 48 heures. Aux dilutions supérieures, l'effet lytique ne se manifeste qu'au 3^e au 4^e jour. Si les cellules sont incubées assez longtemps, l'effet lytique s'accroît dans les tubes positifs, et toute la nappe est atteinte. Au début, des flots de cellules arrondies plus foncées se forment au sein de la couche cellulaire. Ces amas grossissent, et autour la nappe cellulaire se disloque. Des cellules se détachent et flottent dans le milieu. Au bout de 48 heures, ou 3 jours, presque toutes les cellules sont arrondies, groupées en amas encore fixés sur le verre, ou flottant dans le milieu.

A l'examen des lamelles infectées colorées à l'hématéine-éosine, on remarque, en plus des agglomérats de cellules lysées, une pycnose des noyaux.

Toutes les souches que nous avons examinées jusqu'ici ont manifesté un effet cytopathogène sur les cellules KB. Au contraire sur fibroblastes de poulet, certaines ne sont pas cytopathogènes, ou ne le deviennent qu'après 2 ou 3 passages. De plus la lyse des fibroblastes peut être tardive, et alors les cellules témoins non infectées peuvent présenter une dégénérescence non spécifique qui rend difficile le diagnostic. Les cellules KB, par contre, se maintiennent suffisamment longtemps (10 à 12 jours), à condition de renouveler le milieu, pour permettre la mise en évidence d'un effet cytopathogène lent. Signalons que l'effet lytique est plus rapide et plus marqué avec le milieu Earle-hydrolysate de caséine supplémenté avec 10 p. 100 de sérum de veau qu'avec le milieu 199 enrichi de 5 p. 100 de sérum de mouton.

2° Hémagglutination - Hémasorption :

Les hématies fraîches de poule sont agglutinées par le surnageant de cultures cellulaires KB infectées et lysées. Le surnageant témoin provenant de cultures non infectées

hémagglutine au maximum au $1/8^e$. Les cultures infectées hémagglutinent au $1/32^e$, au $1/64^e$ suivant les souches virales. Le titre est assez faible, comparativement aux titres des mêmes virus cultivés sur embryons de poulet (de $1/256^e$ à $1/2.048$).

L'hémasorption est très nette (photo n° 3).

Les hématies restent solidement fixées sur les cellules, malgré de multiples lavages, alors que les cultures-témoins n'en fixent pas. Mais à la température du laboratoire, au bout de 20 à 30 minutes, les hématies se détachent. Nous n'avons que très rarement observé des images en rosettes. Toutes les souches examinées (de collection ou de diagnostics) se sont montrées hémasorbantes. Ce test permet de vérifier l'identité du virus lorsqu'il s'agit d'un diagnostic.

3° Immunofluorescence :

Nous n'avons pas recherché l'apparition de la fluorescence en fonction du temps d'incubation. La fluorescence est très intense au 2^e ou 3^e jour après l'inoculation lorsque environ 50 p. 100 des cellules sont lysées. Pour avoir un contraste net entre les lames infectées et les lames témoins, il est utile de surcolorer au Bleu de méthylène à 1 p. 1.000 sinon la fluorescence de fond des cellules demeure trop importante. Avec le bleu de méthylène comme colorant de contraste il y a disparition presque complète de la fluorescence de fond non spécifique. La fluorescence est surtout localisée au cytoplasme cellulaire, le noyau formant une tache centrale arrondie plus sombre. Dans certaines cellules on distingue un anneau périnucléaire granuleux fluorescent.

Si les lames sont conservées à 4 °C, à l'obscurité, la fluorescence persiste plusieurs semaines, tout en s'atténuant légèrement.

Les cellules KB inoculées avec d'autres virus (Teschén, peste porcine) et colorées avec le conjugué anti-Newcastle n'apparaissent pas fluorescentes.

De plus si l'on traite les cellules infectées, dans un premier temps avec des globulines anti-Newcastle non conjuguées, et dans un deuxième temps avec le conjugué, il y a extinction presque complète de la fluorescence. Ce qui atteste la spécificité de la réaction.



Photos 1 et 2. — La photo n° 1 montre des cellules KB intactes non infectées, la photo n° 2, des cellules infectées en voie de lyse.

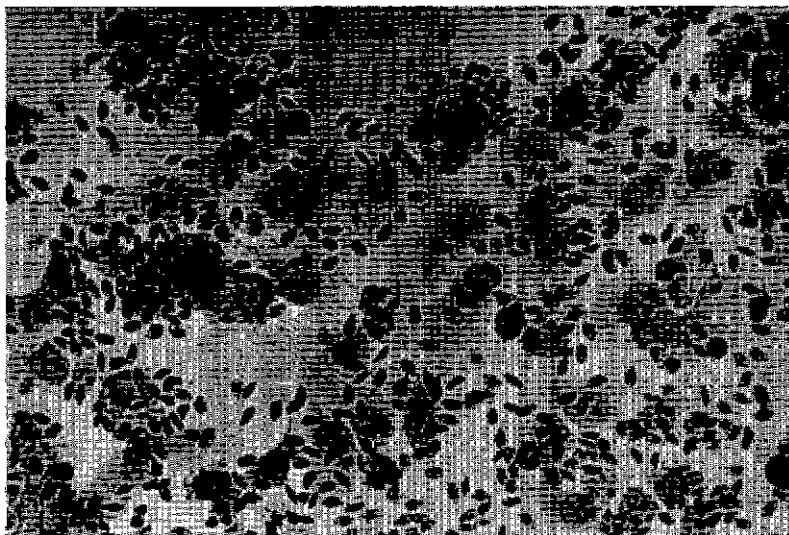


Photo 3. — HémadSORption d'hématies de poule sur cellules KB infectées par le virus de Newcastle (Hématéine-éosine).

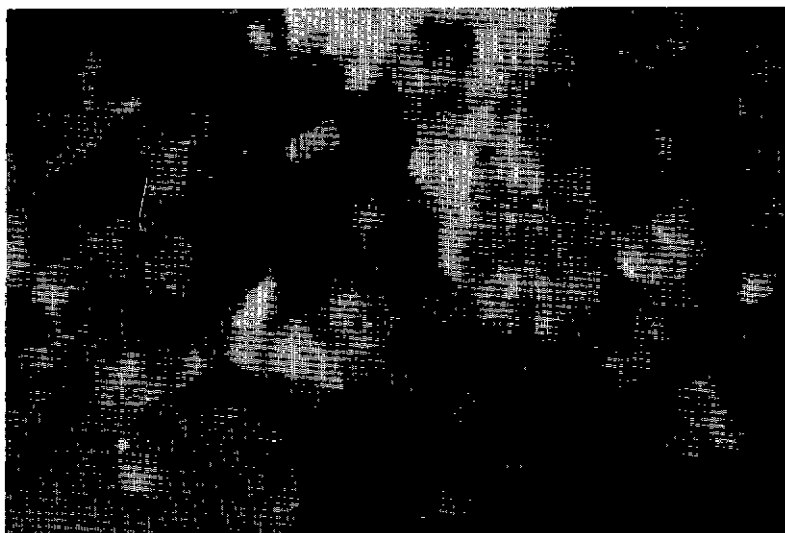


Photo 4. — Cellules KB infectées de virus de Newcastle traitées au conjugué, et au Bleu de méthylène.

4^o Pouvoir immunogène :

Le virus passé sur cellules KB vaccine les poulets au moins jusqu'à la dilution 10^{-3} , les 2 poulets témoins étant morts 4 jours après l'épreuve.

Le titre cytopathogène du virus passé sur KB et ayant servi à la vaccination était de $10^{11,5}$ DICT 50 par 0,5 ml.

B. — Application de ces résultats à l'isolement du virus de Newcastle

1^o Diagnostic de la maladie :

Qu'il s'agisse de souches sauvages ou de collection, il est possible, par l'inoculation des cellules KB d'isoler le virus à partir des viscères de poulet infecté. Nous n'avons pas encore un grand nombre de résultats à relater. Mais nous avons constaté jusqu'à maintenant une parfaite correspondance entre les résultats de l'inoculation au poulet, et ceux obtenus sur cellules KB. Sur une vingtaine de diagnostics, 8 ont été positifs sur poulets et sur KB, les autres, négatifs dans les deux cas. Le résultat peut être plus rapidement connu avec les cellules (48 heures) que par l'inoculation lorsque les souches sont moyennement virulentes et ne tuent le poulet qu'en 4 ou 5 jours. Le test d'hémadsorption complète l'effet cytopathogène. Mais il faut avoir soin de bien choisir des hématies sensibles.

2^o Titrage du virus dans les organes de poulets infectés. Délais d'apparition après l'inoculation expérimentale.

Ayant inoculé expérimentalement des poulets, nous avons cherché à mettre en évidence :

- la richesse en virus des principaux organes et du sang ;
- le délai d'apparition du virus dans ces organes.

Les dilutions de broyats d'organes ont été inoculées sur cellules KB. La présence du virus a été démontrée par son effet cytopathogène, et par hémadsorption. Nous avons calculé les DICT 50 par la méthode de REED et MUENCH. Avec l'une de nos souches virulentes après deux séries d'expériences, et en prélevant les organes sur des poulets sacrifiés au 4^e jour, à l'agonie, nous avons constaté les titres suivants :

Rate	$10^{7,5}$	DICT 50	au gramme
Poumon	10^7	—	—
Rein	10^7	—	—
Foie	$10^{6,5}$	—	—
Cerveau	$10^{0,5}$	—	—

Pour la détection du virus dans les organes en fonction du délai d'incubation, nous avons inoculé aux cellules KB des suspensions au $1/10^6$, ou du sang au $1/10^6$. Les résultats sont groupés dans le tableau n° 1.

Nous avons étudié l'apparition du virus dans le sang au cours des premières 24 heures après l'inoculation. Nous avons inoculé simultanément avec le sang hémolysé (2 ml) des poulets neufs et des cellules KB. Le sang provenait de poulets infectés par voie intramusculaire depuis 5, 15, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 5 heures.

TABLEAU N° I

Diffusion du virus de Newcastle dans les organes de poulet inoculé expérimentalement.

Organe étudié	Temps d'incubation			
	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours
Sang	+	+	+	+
Rate	+	+	+	+
Poumon	+	+	+	+
Foie	-	+	+	+
Rein	-	+	+	+
Cerveau	-	+	+	+

+ = Présence du virus ;
- = Pas de virus décelable.

Les résultats obtenus sur cellules KB et sur poulets se rejoignent. Le virus est décelable dans le sang prélevé 5, 15, 30 minutes et 5 heures après l'inoculation expérimentale. Le sang prélevé 1 et 2 heures après l'infection ne contient pas de virus décelable. Il semblerait donc qu'il y ait une sorte de phase d'éclipse du virus à partir de 1 heure après l'inoculation, puisque le virus n'est plus décelable dans le sang à ce moment-là.

Nos résultats corroborent ceux relatés par BRANDLY (Diseases of poultry) et par LANCASTER (1963). BRANDLY indique que le tro-

pisme des souches est variable, mais que, au cours de 5 infections étudiées, le sang était virulent. Avec notre propre souche à tropisme nerveux, nous constatons aussi une phase d'invasion septicémique. LANCASTER signale que le virus peut être décelé dans presque tous les tissus 48 heures après l'inoculation. Lors de notre expérimentation, nous avons retrouvé le virus 24 heures après l'inoculation dans un certain nombre d'organes et dans le sang.

C. — Titrages des virus de collection

En considérant l'effet cytopathogène et l'hémodsorption, nous avons titré nos souches de collection sur cellules KB. Nous les avons également titrées sur embryons pour voir si les

résultats sur KB étaient voisins de ceux obtenus sur embryons. En outre, pour une souche donnée, nous avons fait simultanément des titrages comparatifs sur 5 séries de cellules KB, et sur 5 séries d'embryons afin d'étudier l'homogénéité de la sensibilité des cellules et des embryons.

1° Résultats des titrages suivant les souches.

Il ressort du tableau n° 2 que :

— mise à part la souche « Maurice », l'écart entre les deux titrages sur embryons et sur KB est inférieur ou égal à 1 logarithme,

— pour la souche vaccinale, les cellules KB sont plus sensibles que les embryons,

— pour une même souche, les résultats varient d'un titrage à l'autre soit sur embryons, soit

TABEAU N° II

Résultats comparatifs des titrages sur KB et sur embryon.

Dénomination des souches	sur KB : DICT 50	sur embryon : DL 50	Ecart en log.
Virus-vaccin P82/1	10^{-10}	$10^{-9,5}$	0,5
Virus-vaccin P82/2	$10^{-9,8}$	10^{-9}	0,8
Virus-vaccin P83/1 congelé	$10^{-10,2}$	-	
Virus-vaccin P83/1 lyophilisé	$10^{-9,7}$	-	
Virus-vaccin P83/2	$10^{-11,5}$	$10^{-10,9}$	0,6
Virus-vaccin P83/3	$10^{-9,6}$	$10^{-9,3}$	0,3
Virus-vaccin P84	$10^{-12,5}$	$10^{-12,1}$	0,4
Souche malgache virulente	10^{-11}	$10^{-11,8}$	0,8
Souche malgache virulente	$10^{-12,5}$	$10^{-11,5}$	1
Souche "Toulouse 1" virulente	10^{-12}	$10^{-12,3}$	0,3
Souche "Toulouse 2" virulente	$10^{-12,5}$	$10^{-12,2}$	0,3
D 1148	$10^{-11,3}$	$10^{-10,7}$	0,6
Souche "Pakistan"	$10^{-12,5}$	$10^{-11,5}$	1
Souche "Maurice"	$10^{-11,5}$	$10^{-9,5}$	2

sur cellules : par exemple pour P 82/1 et P 82/2 qui représentent 2 titrages de la même souche à des moments différents. De même pour P 83/1 - P 83/2 - P 83/3. Ceci peut provenir du temps de stockage des souches, mais aussi d'une sensibilité hétérogène des embryons ou des cellules. C'est pour vérifier cette hypothèse que nous avons titré la même souche simultanément sur plusieurs séries de cellules et d'embryons.

2° Résultats des titrages suivant les séries inoculées.

Nous avons inoculé, par dilution, 5 embryons ou 5 tubes KB (tableau 3).

En s'en tenant à ces résultats, on peut estimer que l'écart de titrage selon les séries sur KB est de 5 à 10 fois moindre que l'écart de titrage sur embryons. Par conséquent la sensibilité des cellules est plus homogène que celle des embryons.

TABLEAU N°III

Résultats comparatifs des titrages de la souche P83 suivant les séries d'inoculation.

N° de la série	DICT 50 sur KB	DICT 50 moyenne	Ecart	DL 50 sur embryon	DL 50 moyenne	Ecart
1	$10^{-11,6}$	$10^{-11,54}$	0006	$10^{-11,1}$	$10^{-10,9}$	002
2	$10^{-11,5}$		0005	$10^{-11,4}$		005
3	$10^{-11,6}$		0006	$10^{-11,3}$		004
4	$10^{-11,5}$		0004	10^{-11}		001
5	$10^{-11,5}$		0004	$10^{-10,7}$		002

SUMMARY

Note on the use of KB cells for the diagnosis of Newcastle disease, and titration of the virus

The action of Newcastle virus on KB cells has been studied. A cytopathogenic effect which results in the lysis of the cells by the virus has been observed. The hemadsorption test was positive with chicken red cells. The supernatant of centrifugated infected cells was slightly haemagglutinant. The viral antigen could be evidenced in the cell cytoplasm by immunofluorescence method.

The wild viruses could be isolated and characterized in the KB cells. An easy and fairly quick diagnosis of the disease is therefore possible.

The titrations of the virulence of inoculated chicken organs showed that the spleen and the lungs are very rich in virus. The virus could be evidenced in some organs 24 hours after inoculation.

The use of KB cells for the titration of Newcastle virus gave similar results to those obtained in embryos, but the cells seemed to have a more homogeneous susceptibility than embryos.

RESUMEN

Utilización de las células KB para el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle y el dosaje del virus

Se estudia el comportamiento del virus de Newcastle sobre las células KB. El virus produce un efecto citopatogénico claro provocando la lisis de las células. Es positiva con las hemáticas de gallinas la prueba de hemadsorción. El líquido

sobrenadando de centrifugación de los cultivos infectados es poco hemaglutinante. Mediante la técnica de inmunofluorescencia, el antígeno viral aparece sobretodo en el citoplasma celular.

Se pueden aislar y caracterizar los virus salvajes en los cultivos de KB, lo que permite un diagnóstico fácil y bastante rápido de la enfermedad.

Los dosajes de virulencia de los órganos de pollos inoculados muestran que el bazo y el pulmón son muy ricos de virus. Algunos órganos contienen el virus revelable 24 horas después de la inoculación.

La utilización de las células KB en el dosaje de los virus de Newcastle da resultados bastante próximos de los obtenidos sobre embriones. Las células tienen una sensibilidad más homogénea que los embriones.

BIBLIOGRAPHIE

- BANKOWSKI (R. A.) et Coll. — Cultivation and cytopathogenicity of Newcastle disease virus in Hela and bovine Kidney cell cultures. *Am. J. Vet. Res.*, 1957, 18,743.
- BANKOWSKI (R. A.). — Personnel communication (University of California 1958) in *Advances in Veterinary Science*, 1959.
- BRANDLY (C. A.). — Newcastle disease (dans *Diseases of poultry*). Edité par the Iowa State University Press., 1959.
- CHANOCK (R. M.). — Cytopathogenic effect of Newcastle virus in monkey Kidney cultures and interferences with poliomyelitis viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, 89,379.
- GELENGZEI et Coll. — Studies of Newcastle disease strains in various cell cultures. *Am. J. Vet. Res.*, 1960, 21,987.
- LANCASTER (J. E.). — Diagnosis of Newcastle disease. *Vet. Bull.*, 1963, 33,347.
- MASON et Coll. — Newcastle disease virus in cultures of chicken embryo tissues. Its multiplication, titration, and cytopathogenicity. *Am. J. Pathol.*, 1955, 31,883.
- PEREIRA (H. G.) et Coll. — The growth of Fowl plague and Newcastle disease viruses in roller tube cultures. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1954, 67,109.
- PIGOURY (L.), MICHEL (C.), CHABASSOL (C.). — Note sur le pouvoir cytopathogène du virus de la maladie de Newcastle cultivé sur cellules KB. *Ann. Inst. Past.*, 1962, 103,443.
- PROVOST (A.) et Coll. — Un nouveau vaccin injectable contre la maladie de Newcastle préparé en cultures de cellules bovines. *Bull. Acad. Vet. Fr.*, 1962, **35** (9) : 399.
- RAMISSE (J.) et Coll. — Possibilité de diagnostic sérologique de la maladie de Newcastle sur le cadavre. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1967, **20**, 205.
- SHIMIZU et Coll. — Multiplication of Newcastle disease virus and Fowl plague virus in swine Kidney tissue cultures. *Jap. J. Exp. Med.*, 1957, 27,181.
- TYRRELL (D. A. J.). — New tissue culture systems for influenza, Newcastle diseases, and vaccinia viruses. *J. Immunol.*, 1955, 74,293.